

BH

JAPANESE PATENT OFFICE (JP)  
PATENT JOURNAL (A)  
KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 1[1989]-226900

Int. Cl.<sup>4</sup>:

C 07 K 15/14  
A 61 K 37/465  
C 07 K 3/12  
3/16  
3/18  
13/00  
C 12 P 21/00

Sequence Nos. For Office Use:

8318-4H  
8615-4C  
8318-4H  
B-6712-4B

Filing No.:

Sho 63[1988]-54159

Filing Date:

March 8, 1988

Publication Date:

September 11, 1989

No. of Claims:

3(Total of 6 pages)

Examination request:

Not filed

METHOD FOR PURIFYING PROTEIN C

Inventors:

Kenji Tanaka  
1473-8, Shiro-machi  
Yamatokooruyama-shi, Nara-ken

Yatsuhiko Kamimura  
5-18-215, Miya-machi  
Hirakata-shi, Osaka-fu

Kazumasa Yokoyama  
2-7-2-201, Terauchi  
Toyonaka-shi, Osaka-fu

Applicant:

The Green Cross Corporation  
15-1, 1-chome, Imahashi, Higashi-ku  
Osaka-shi, Osaka-fu

Agent:

Hajime Takashima, patent attorney

[Amendments have been incorporated into text of translation.]

Claims

1. Method for purifying protein C, characterized by containing a process of recovery of the supernatant after isoelectric precipitation of a protein-containing solution at pH 4-6.
2. Method for purifying protein C, characterized by containing a process of elution with an organic solvent having a concentration gradient from 10 to 80 v/v% after a protein-containing solution is added to a reversed-phase chromatographic carrier at pH 1-2.
3. Method for purifying protein C, composed of the following processes: a protein-containing solution is
  - (a) subjected to isoelectric precipitation at pH 4-6, then the supernatant is recovered
  - (b) added to a cation exchanger at pH 4-6, followed by eluting with 0.1-2M salt solution
  - (c) added to an anion exchanger at pH 6-9, followed by eluting with a salt solution having concentration gradient of 0.2-2M
  - (d) gel filtration process using a carrier with a fractionation molecular weight in the range of 1000-1,000,000
  - (e) elution process using a salt solution having a concentration gradient of 0-2M after adding to an immobilized sulfated polysaccharide at pH 5-7
  - (f) elution process using an organic solvent having a concentration gradient of 10-80 v/v% after adding to a reversed-phase chromatographic carrier at a pH 1-2.

Detailed explanation of the invention

Industrial application field

The present invention pertains to a method for purifying protein C.

Prior art

Protein C is a protein containing  $\gamma$ -carboxyglutamic acid (Gla), which is an amino acid, synthesized in the presence of vitamin K, and it is named protein C after the fraction number "C" of the chromatography in the purification of serum. Protein C is mainly synthesized in the liver as a one-chain glycoprotein with a molecular weight of 62,000, and in circulating blood it mainly exists as a two-chain molecule (L chain and H chain). Protein C is a serine protease precursor

enzyme similar to factor IX, factor X, and factor VII of Gla-containing coagulation factor, and its structure resembles these factors, and they have approximately 40% homology.

The thrombin generated by the coagulation mechanism of living things forms a complex with thrombomodulin which is a unique receptor present in the arterial endothelium, and loses various catalysis for its original coagulation factor, and becomes entirely a strong activator of protein C. Protein C is subjected to limited degradation by the complex and becomes activated protein C (APC), which is a very efficient coagulation fibrinolysis-regulating factor having both anticoagulation and fibrinolysis stimulation. Its action mechanism is selective degradation and deactivation of F. Va and F. VIIIa, which are coenzymes in the so-called protease and prothrombinase complex on the phospholipid of the endothelial surface, to inhibit blood coagulation strongly. APC selectively degrades PAI (plasminogen activator inhibitor) of tPA inhibition factor and also promotes the fibrinolysis reaction.

For purification of protein C, several methods have been known, such as the precipitation adsorption method using barium chloride, ammonium sulfate fractionation, anion exchanger treatment, preparative electrophoresis, antibody column for protein C, antibody column for protein admixture, etc. J. Biol. Chem., Vol. 251, pp. 355-363, (1976); ibid., Vol. 258, pp. 1914-1920, (1983); J. Nara Med. Ass., Vol. 35, pp. 448-454, (1984); J. Biol. Chem., Vol. 261, pp. 11097-11105, (1986); Thromb. Haemostas., Vol. 48, pp. 1-5, (1983)).

However, the present inventors found that when the above-mentioned methods were used, either satisfactory results were not obtained in purity, yield, and working efficiency, or they were not suitable for purification of a large amount of protein.

#### Problems to be solved by the invention

Thus the present inventors investigated a method for efficient isolation and purification of protein C, and as a result they found that the isoelectric precipitation method and reversed-phase chromatography were effective, and furthermore, they found a method for purifying protein C using these processes, and thereby they completed the present invention.

#### Means to solve the problems

Namely the present inventions are as follows:

Invention 1: a method for purifying protein C, characterized by containing the process of recovering the supernatant after a protein-containing solution is subjected to isoelectric point precipitation at pH 4-6.

Invention 2: a method for purifying protein C, characterized by containing the process of elution with an organic solvent having a concentration gradient of 10-80 v/v% after a protein C-containing solution is added to a reversed-phase chromatographic carrier at pH 1-2.

Invention 3: a method for purifying protein C, characterized by containing the following processes: a protein C-containing solution is

- (a) subjected to isoelectric precipitation at pH 4-6, then the supernatant is recovered,
- (b) added to a cation exchanger at pH 4-6, followed by eluting with a 0.1-2M salt solution,
- (c) added to an anion exchanger at pH 6-9, followed by eluting with a salt solution having a concentration gradient of 0.2-2M,
- (d) subjected to a gel filtration process using a carrier with a fractionation molecular weight in the range of 1000-1,000,000,
- (e) subjected to an elution process using a salt solution having a concentration gradient of 0-2M after adding to an immobilized sulfated polysaccharide at pH 5-7,
- (f) subjected to an elution process using an organic solvent having a concentration gradient of 10-80 v/v% after adding to a reversed-phase chromatographic carrier at a pH 1-2.

#### [1] Starting materials

There is no restriction to the protein C-containing solution used in the present invention as long as it originates from human serum.

Concrete examples include fractions containing blood coagulation factor IX, fractions containing concentrated prothrombin complex, and other fractions containing protein C.

#### [2] Purification method

##### (a) Isoelectric point precipitation method

At the isoelectric point, the solubility of protein is minimal; therefore, it precipitates. By utilizing this property, the protein is purified.

Namely, in this process a protein C-containing solution is treated at pH 4-6 and then the supernatant is recovered.

At this point, the treatment temperature is 2-6°C and the treatment time is 6-24 h.

After the treatment, it is centrifuged at 5000-20,000 G for 10-60 min and then the supernatant is recovered.

##### (b) Treatment with cation exchangers

The protein C-containing solution obtained in the above (a) is added to a cation exchanger at pH 4-6.

For the cation exchangers, Bakerbond CB<sub>x</sub> having a carboxymethyl group as a ligand or CM-Sepharose CL-6B can be used.

Then the protein C-containing fractions obtained by eluting with a salt solution having a concentration of 0.1-2M and at the same pH are recovered.

(c) Treatment with anion exchangers

The protein C-containing solution obtained in (b) is added to an anion exchanger at pH 6-9.

For the anion exchangers, Mono Q (QAE system) used in high-performance liquid chromatography, etc., can be used.

Then, after washing with a salt solution having a concentration of 0.2-0.3 M and the same pH, elution is carried out using a salt solution having a concentration gradient of 0.2-2M and the identical pH for recovering protein C-containing fraction.

(d) Gel filtration

The protein C-containing solution obtained in (c) is added to a gel filtration carrier having a fractionation molecular weight of 1000-1,000,000.

For such a carrier, Sapense 12 with agarose as a base material for high-performance liquid chromatography, etc., can be used.

The elution can be carried out using a solution with a pH 6-8 and salt concentration of 0.1-2M for recovering protein C-containing fraction.

(e) Treatment with immobilized sulfated polysaccharide

The protein C-containing solution obtained in (d) is added to an immobilized sulfated polysaccharide under the condition of pH 5-7.

Dextran sulfate, Sepharose CL4B with heparin as a ligand, etc., may be used for the immobilized sulfated polysaccharide.

Then elution can be carried out using a salt solution having a concentration gradient of 0-2.0M and identical pH for recovering protein C-containing fraction.

(f) Reversed-phase chromatography

The protein C-containing solution obtained in (e) is added to a reversed-phase chromatographic carrier under the condition of pH 1-2.

For the reversed-phase chromatographic carrier, a reversed-phase column using C<sub>18</sub> is a ligand can be used.

Then elution can be carried out using an organic solvent (such as acetonitrile, methanol, ethanol, propanol, dioxane, etc.) with concentration gradient from 10-80 v/v% and identical pH for recovering protein C-containing fraction.

After each process is carried out, if necessary, ammonium sulfate fractionation or dialysis can be carried out.

Namely, the ammonium sulfate fractionation can be carried out by treating the protein C-containing solution with a 60-80% ammonium sulfate saturated solution, and then the precipitate fraction is recovered.

The dialysis can be carried out under the conditions of pH 4-7, 2-6°C, and 6-24 hours.

In the present invention, furthermore, it is possible to combine it with known purification processes.

The thus-obtained protein C can be used as a biochemical reagent and pharmacological reagent, and if it is to be used as a pharmaceutical, or in sterilization, bacteria removal, or freeze-drying, it can be carried out using known techniques used in preparing pharmaceuticals, and then the pharmaceutical can be prepared.

### Effect

According to the present invention, protein C can be efficiently isolated and purified. Moreover, the operation of the method of the present invention is simple and it can be used in large-scale preparation. Accordingly, it is very useful as a method for preparing protein C.

### Application examples

In order to explain the present invention in more detail, application examples will be used; however, the present invention is not limited to these application examples.

#### [1] Purification method

(1) 10 mL of distilled water were added to one vial of Chrismycin [transliteration] formulation and after complete dissolution, dialysis was carried out using a 20 mM sodium acetate buffer solution (pH was 5.0). After the dialysis it was centrifuged at 10,000 G for 20 min and then the supernatant was recovered.

#### (2) Cation-exchange chromatography

The supernatant fraction was added to a Bakerbond CB<sub>x</sub>. For the starting buffer solution, 20 mM sodium acetate solution (pH 5.0) was used, and for the eluting buffer solution 1M sodium chloride-20 mM sodium acetate solution (pH 5.0) was used. After the addition of a sample, it was washed with the starting buffer solution and then it was switched to the eluting buffer solution for recovering the passed fraction.

#### (3) Anion-exchange chromatography

The dialyzate (solution obtained from dialysis) was added to a Mono Q HR 60/10 (or Q Sepharose High Performance 60/100). A 20 mM tris-HCL buffer solution (pH 7.15) was used for the starting buffer solution, and 1M sodium chloride-containing 20 mM tris-HCL buffer solution (pH 7.15) was used for the eluting buffer solution. After the sample was added, it was washed with 30% (v/v) eluting buffer/startling buffer and then linear gradient elution was carried out using 30% → 40% eluting buffer solution/startling buffer solution for recovering the active fraction.

#### (4) Gel-filtration chromatography

The dialyzate obtained was added to Superose 12 prep grade 60/600; then, 20 mM tris-HCL buffer solution containing 500 mM sodium chloride (pH 7.2) was used as an eluting buffer solution and the active fraction was recovered.

(5) Dextran sulfate chromatography

The dialyzate was added to Sepharose CL4B with dextran sulfate as a ligand. 25 mM imidazole (pH 6) was used as a starting buffer solution, and 1M sodium chloride-containing 25 mM imidazole (pH 6.0) was used as an eluting buffer solution. After the addition of the sample, a linear gradient elution with 0% → 50% eluting buffer solution/starting buffer solution was carried out and the active fraction was recovered.

(6) Reversed-phase chromatography

The thus-obtained fraction was added to a reversed-phase column with C8 as a ligand. Stock solutions A (distilled water containing 0.1% tetrafluoroacetic acid) and B (prepared by diluting 800 mL acetonitrile with solution A to 1,000 mL) were prepared. Solution A was added to 400 mL of solution B to a total volume of 1000 mL (final concentration of acetonitrile was 32%) and then the thus-obtained mixture was used as a starting buffer solution, and solution A was added to 500 mL of solution B to a total volume of 1000 mL (final concentration of acetonitrile was 40%) and then the thus-obtained mixture was used as an eluting buffer solution. After washing with the starting buffer solution, a linear gradient elution with 0% → 50% eluting buffer solution (the actual acetonitrile concentration was 32% → 36%) was carried out. After the fractionation, the organic solvent in each fraction was dried under reduced pressure.

[2] Measurements

(1) Ouchterlony's method

10  $\mu$ L each of the sample and various antisera were added to 1.2% agar gel which was prepared using a general method. After it was allowed to stand at 4°C overnight and after confirming the formation of a sedimentation line, said gel was dehydrated with filter paper and washed with physiological saline solution; then, the dehydration and washing were repeated twice, and Coomassie staining was carried out using a common method.

(2) Immunoelectrophoretic method

1.2% agar gel was prepared (pH 8.6,  $\mu$  = 0.06) and after 10  $\mu$ L of a sample were added, electrophoresis was carried out at 4°C for 4 h at 2 mA per 1 cm gel width. After the electrophoresis, 100  $\mu$ L antiserum were added to each channel and then allowed to stand at 4°C overnight, and after confirming the formation of a sedimentation line, said gel was dehydrated with a filter paper and washed with a physiological saline solution; then, the dehydration and washing were repeated twice, and Coomassie staining was carried out using a common method.

### (3) Method for measuring activity

A sample was diluted with 20 mM tris-HCL buffer solution containing 100 mM sodium chloride (pH 8.5), then it was used for measurement. Protac C (3 units/vial) was diluted with 12 mL distilled water and used. The coloring substrate MCA-3112 v was used after the contents of a vial (5.1 mg, 7.0  $\mu$ mol) were dissolved completely in 1 mL dimethyl sulfoxide, then it was diluted with 85 mL 20 mM tris-HCL buffer solution (pH 8.5). A 20% (v/v) aqueous acetic acid solution was used for terminating the reaction. The flow chart for the measurement is shown in Table 1.

Table 1. Method for analyzing protein C using Protac C

//insert, p. 5//

Key: 1 Protein C sample  
2 Protac C  
3 Incubation at 30°C for 20 min  
4 Acetic acid  
5 Measurement

The purification steps, activity recovery, and degree of purification are shown in Table 2.

Table 2

//insert Table II, p.5//

Key:	1	Step
	2	Volume
	3	PC activity
	4	Yield
	5	Degree of purification (blood plasma = 1)
	6	Concentrated solution of prothrombin complex
	7	Isoelectric precipitation
	8	Cation-exchange chromatography
	9	Anion-exchange chromatography
	10	Gel-filtration chromatography
	11	Dextran sulfate chromatography
	12	Reversed-phase chromatography

[4] [sic; 3] Physical and chemical properties of purified protein C

The results of molecular weight measurement using the SDS-PAGE method show that under nonreductive SDS-PAGE, a band was recognized at molecular weight 62,000, and under reduction conditions, two bands comprising an H band at molecular weight 41,000 and an L band at molecular weight 21,000 were recognized.

In the immunoelectrophoresis, one clear sedimentation line was recognized only at the  $\alpha$ -position, and no sedimentation line was formed for antihuman PS, F. II, F. IX, F. X rabbit serum including antinormal human serum and rabbit serum.

The results of isoelectric focusing (isoelectric point electrophoresis) showed that protein C was recognized as a continuous band between pI 3.8 and 4.2.

From the above results, we presumed the purity of the isolated protein C to be 99% or greater.

## ⑯ 公開特許公報 (A) 平1-226900

⑯ Int. Cl.

C 07 K 15/14  
 A 61 K 37/465  
 C 07 K 3/12  
 3/16  
 3/18  
 13/00  
 C 12 P 21/00

識別記号

庁内整理番号

⑯ 公開 平成1年(1989)9月11日

8318-4H  
 8615-4C

8318-4H

B-6712-4B 審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

⑯ 発明の名称 プロテインCの精製方法

⑰ 特 願 昭63-54159

⑰ 出 願 昭63(1988)3月8日

⑰ 発明者 田中 憲次 奈良県大和郡山市城町1473-8

⑰ 発明者 上村 八尋 大阪府枚方市三矢町5-18-215

⑰ 発明者 横山 和正 大阪府豊中市寺内2-7-2-201

⑰ 出願人 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市東区今橋1丁目15番地の1

⑰ 代理人 弁理士 高島 一

## 明細書

## 1. 発明の名称

プロテインCの精製方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) プロテインC含有溶液を等電点沈澱法により、pH 4～6の条件下で処理して上清を回収する工程を含むことを特徴とするプロテインCの精製方法。

(2) プロテインC含有溶液を逆相クロマト用担体にpH 1～2の条件下で添加した後、有機溶媒濃度10v/v%から80v/v%までの濃度勾配で溶出する工程を含むことを特徴とするプロテインCの精製方法。

(3) プロテインC含有溶液を、

(a) 等電点沈澱法により、pH 4～6の条件下で処理して上清を回収する工程、

(b) 陽イオン交換体にpH 4～6の条件下で添加した後に塩濃度0.1～2Mの条件で溶出させる工程、

(c) 陰イオン交換体にpH 6～9の条件下で添加した後に塩濃度0.2から2Mまでの濃度勾配で溶

出させる工程、

(d) 分子量範囲1000～100万のゲル通過用担体を用いてゲル通過を行う工程、

(e) 固定化硫酸多糖類にpH 5～7の条件下で添加した後に塩濃度0Mから2Mまでの濃度勾配で溶出させる工程、

(f) 逆相クロマトグラフィー用担体にpH 1～2の条件下で添加した後に有機溶媒濃度10v/v%から80v/v%までの濃度勾配で溶出させる工程、

からなるプロテインCの精製方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明はプロテインCの精製方法に関する。

## 〔従来技術〕

プロテインCは、ビタミンKの存在下に合成されるアミノ酸のγ-カルボキシグルタミン酸(C1a)を含有する蛋白質の一つであり、血漿からの精製過程におけるクロマトグラフィーの分画番号"C"にちなんで命名されたものである。プロ

テインCは、分子量62,000の1本鎖糖蛋白質として主に肝で合成され、循環血液中では大部分は2本鎖分子(L鎖およびH鎖)として存在する。プロテインCは、G I a含有凝固因子のX因子、X因子、VII因子と同様のセリンプロテアーゼ前駆酵素であり、その構造はこれら因子に類似し、相互に40%程度の相同性が存在する。

生体の凝固機転により生成されたトロンビンは、血管内皮細胞膜上に存在する特異的レセプターであるトロンボモジュリン(thrombomodulin)と複合体を形成して、本来の凝固因子としての種々の触媒作用を失い、もっぱらプロテインCの強力なアクチベーターとなる。プロテインCはこの複合体により限定分解を受けて活性化プロテインC(APC:活性化されたプロテインC)となり、抗凝固と線溶促進の両方の作用を持つ極めて効率のよい凝固線溶調節因子となる。その作用機序は血小板膜および内皮細胞膜表面のリン脂質上で、いわゆるテンナーゼおよびプロトロンビナーゼ複合体中の補酵素であるF. VaとF. VIIaを

選択的に分解し、活性化することで血液凝固反応を強く阻止する。またAPCは、tPA阻害因子のPAI(プラスミノーゲン・アクチベーター・インヒビター)を選択的に分解し、線溶反応をも促進させる。

プロテインCの精製方法としては、塩化バリウムによる沈澱吸着法、硫酸分画、陰イオン交換体による処理、調整用電気泳動、プロテインCに対する抗体カラム、夾雜蛋白質に対する抗体カラムなどが知られている。[J. Biol. Chem., 251, 355~363 (1976), 同, 258, 1914~1920 (1983), J. Nara Med Ass., 35, 448~454 (1984), J. Biol. Chem., 261, 11097~11105 (1986), Thromb. Haemostas., 48, 1~5 (1983)]

しかし、上記の方法によっては、精製度、收率、作業効率の点で満足すべき結果が得られない。あるいは蛋白質の大量精製には向きであることが本発明者らによって知見された。

#### 〔発明が解決しようとする課題〕

そこで本発明者らは、プロテインCを効率良く

精製単離できる方法を検討したところ、等電点沈澱法、逆相クロマトグラフィーの使用が有効であることを見出し、さらに、これらの工程を軸としたプロテインCの精製方法を見出し、本発明を完成了。

#### 〔課題を解決するための手段〕

即ち、本発明は次の通りである。

##### 発明1:

プロテインC含有溶液を等電点沈澱法により、pH 4~6の条件下で処理して上清を回収する工程を含むことを特徴とするプロテインCの精製方法。

##### 発明2:

プロテインC含有溶液を逆相クロマト用担体にpH 1~2の条件下で添加した後、有機溶媒濃度10v/v%から80v/v%までの濃度勾配で溶出する工程を含むことを特徴とするプロテインCの精製方法。

##### 発明3:

プロテインC含有溶液を

(a) 等電点沈澱法により、pH 4~6の条件下で

処理して上清を回収する工程、

(b) 陽イオン交換体にpH 4~6の条件下で添加した後に塩濃度0.1~2Mの条件下で溶出させる工程、

(c) 陰イオン交換体にpH 6~9の条件下で添加した後に塩濃度0.2から2Mまでの濃度勾配で溶出させる工程、

(d) 分画分子量範囲1000~100万のゲル通過用担体を用いてゲル通過を行う工程、

(e) 固定化硫酸多糖類にpH 5~7の条件下で添加した後に塩濃度0Mから2Mまでの濃度勾配で溶出させる工程、

(f) 逆相クロマト用担体にpH 1~2の条件下で添加した後に有機溶媒濃度10v/v%から80v/v%までの濃度勾配で溶出させる工程、からなるプロテインCの精製方法。

##### (1) 出発原料

本発明で使用されるプロテインC含有溶液は、ヒト血漿に由来するものであれば特に限定されない。

具体的には血漿因子含有部分、濃縮プロトロンビン複合体含有部分およびその他プロテインC含有部分等が例示される。

(2) 精製方法

(a) 等電点沈澱法

等電点沈澱法とは、蛋白質が等電点において溶解度が最小になって沈澱を生じるのでこれを利用して、蛋白質を精製する方法である。

即ち、本工程においてはプロテインC含有溶液をpH 4～6の条件下で処理して上清を回収する。

その際の処理温度は2～6℃であり、処理時間は6～24時間である。

当該処理後、5000～2万g、10～60分間遠心分離して上清を回収する。

(b) 陽イオン交換体による処理

(a)で得たプロテインC含有溶液を陽イオン交換体にpH 4～6の条件下で添加する。

陽イオン交換体としてはカルボキシメチル基をリガンドとする Bakerbond CBx あるいは CM-Sephadex CL-6B 等が例示される。

(c) 固定化硫酸多糖類による処理

(d)で得たプロテインC含有溶液をpH 5～7の条件下で固定化硫酸多糖類に添加する。

固定化硫酸多糖類としては硫酸デキストラン、ヘパリンをリガンドとする Sephadex CL4B 等が例示される。

その後、同一pH、塩濃度0Mから20Mまでの濃度勾配で溶出を行い、プロテインC含有部分を回収する。

(f) 逆相クロマトグラフィー

(e)で得たプロテインC含有溶液をpH 1～2の条件下で逆相クロマトグラフィー用担体に添加する。

逆相クロマトグラフィー用担体としてはC<sub>18</sub>をリガンドとした逆相カラム等が例示される。

その後、同一pH、有機溶媒（たとえば、アセトニトリル、メタノール、エタノール、プロパンール、ジオキサン等）濃度10v/v%から80v/v%までの濃度勾配で溶出を行い、プロテインC含有部分を回収する。

なお、各々の工程を行った後、所望により確定

その後、同一pH、塩濃度0.1～2Mの条件下で溶出させたプロテインC含有部分を回収する。

(c) 陰イオン交換体による処理

(b)で得たプロテインC含有溶液を陰イオン交換体にpH 6～9の条件下で添加する。

陰イオン交換体としては高速液体クロマトグラフ用 Mono Q (QAE系) 等が例示される。

その後、同一pH、塩濃度0.2～0.3Mの条件下で洗浄した後、同一pH、塩濃度0.2Mから2.0Mまでの濃度勾配で溶出を行い、プロテインC含有部分を回収する。

(d) ゲル通過

(c)で得たプロテインC含有溶液を分子量範囲1000～100万のゲル通過用担体に添加する。

このような担体としてはアガロースを基材とした高速液体クロマトグラフ用 Sephase 12等が例示される。

溶出は、pH 6～8、塩濃度0.1～2Mで行いプロテインC含有部分を回収する。

分画あるいは透析等を行う。

すなわち、確定分画はプロテインC含有溶液を60～80%飽和濃度の確定で処理し、その沈澱部分を回収することにより行われる。

また、透析は、pH 4～7の条件下に2～6℃、6～24時間行われる。

本発明においてはさらに、公知の精製工程を組み合わせることも可能である。

かくして得られたプロテインCは、生化学用、薬理学用の試薬として用いてもよく、また、医薬品として用いる場合には医薬品製造の通常技術に従って、要すれば、滅菌、除菌、凍結乾燥、製剤化等を行えばよい。

(効果)

本発明の方法によれば、プロテインCを効率よく単離精製できる。しかも、本発明の方法は操作が簡略で、大規模製造にも適用できる。従って、プロテインCの精製方法として極めて有用である。

(実施例)

本発明をより詳細に説明するために、実施例を

挙げるが、本 **○** これらによって何ら限定されるものではない。

#### (1) 精製方法

1) クリスマシン製剤1バイアルに10μlの蒸留水を加えて、完全に溶解させた後、20mM酢酸ナトリウム、pH5.0の緩衝液で透析した。透析後、10,000Gで20分間遠心分離して上清液を回収した。

#### 2) 隅イオン交換クロマトグラフィー

上清液を Bakerbond CBxに添加した。開始バッファーに20mM酢酸ナトリウム、pH5.0を、溶出バッファーに1M塩化ナトリウム、20mM酢酸ナトリウム、pH5.0を使用した。試料添加後開始バッファーで洗浄した後、溶出バッファーに切換え、バ尔斯を回収した。

#### 3) 隅イオン交換クロマトグラフィー

透析後液を Mono Q HR 60/10(またはQ Sepharose High Performance 60/100)に添加した。開始バッファーに20mMトリス塩酸、pH7.15を、溶出バッファーに1M 塩化ナトリウム、20mMトリス塩

#### 6) 逆相クロマトグラフィー

得られた画分を C8をリガンドとした逆相カラムに添加した。ストック溶液A (0.1%テトラフルオロ酢酸含有蒸留水)・B (800μlのアセトニトリルをA液で1,000μlとしたもの)を調製し、開始バッファーは400μlのB液にA液を加えて1,000μlとし(アセトニトリル最終濃度32%)、溶出バッファーは500μlのB液にA液を加えて1,000μlとして(アセトニトリル最終濃度40%)使用した。開始バッファーで洗浄後、0%→50%溶出バッファー(実際のアセトニトリル濃度は32%→36%)のリニアーグラジェント溶出を行った。分画後各フラクション中の有機溶媒を減圧乾燥させた。

#### (2) 測定

##### 1) オクタロニー法

常法通りに作成した1.2%の寒天ゲルに試料および各種抗血清を10μlずつ添加した。4℃で一晩放置して沈降線を確認後に、同ゲルを滤紙で脱水・生理食塩水で洗浄し、脱水洗浄をさらに2回繰り返したのちに常法通りにクーマシー染色した。

酸、pH7.15を **○** した。試料添加後、30% (v/v)溶出バッファー/開始バッファーで洗浄した後、30%→40%溶出バッファー/開始バッファーのリニアーグラジェント溶出を行い、活性画分を回収した。

##### 4) ゲルフィルトレーションクロマトグラフィー

透析後液を Superose 12 prep grade 60/600に添加した。溶離バッファーに20mMトリス塩酸、500mM塩化ナトリウム、pH7.2緩衝液を使用し、活性画分を回収した。

##### 5) デキストランサルフェートクロマトグラフィー

透析後液を硫酸デキストランをリガンドにしたセファロースCL4Bに添加した。開始バッファーには25mMイミダゾール、pH6を、溶出バッファーには1M 塩化ナトリウム、25mMイミダゾール、pH6.0を使用した。試料添加後、0%→50%溶出バッファー/開始バッファーのリニアーグラジェント溶出を行い、活性画分を回収した。

繰り返したのちに常法通りにクーマシー染色した。

##### 2) 免疫電気泳動法

1.2%の寒天ゲルを作成し(pH8.6、μ=0.06)、試料10μlを添加後、ゲル巾1cmあたり2mAで約4時間、4℃で泳動した。泳動後、各溝に抗血清100μlを添加し、4℃で一晩放置して沈降線を確認後に、同ゲルを滤紙で脱水・生理食塩水で洗浄し、脱水洗浄をさらに2回繰り返したのちに常法通りにクーマシー染色した。

##### 3) 活性測定法

試料は20mMトリス塩酸、100mM塩化ナトリウム、pH8.5緩衝液にて希釈後、測定に供した。プロタックC (PROTAC C) (3単位/バイアル)は蒸留水12μlで希釈して使用した。発色基質MCA-3112vは、1バイアル(5.1mg、7.0μmole)の内容物を1μlのジメチルスルホキシドで完全に溶解した後、85μlの20mMトリス塩酸、pH8.5緩衝液で希釈して使用した。反応停止液は、20% (v/v) 酢酸水溶液を使用した。測定フローシートを第1表に示した。

第1表 プロタックCを用いたプロテインC分析法

プロタックCサンプル	50 $\mu$ g	容量 (ml)	A280	PC活性 (IE)	収率 (%)	精製度 (血漿-1)
→プロタックC	100 $\mu$ g					
30°C、20分間インキュベート						
→Peptidyl-MCA	1,000 $\mu$ g					
(MCA-3112V: Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA)						
30°C、20分間インキュベート						
→酢酸	1,500 $\mu$ g					
測定 Ex370/E <sub>460</sub>						

精製ステップ、活性回収率および精製度を第2表に示した。

#### (4) 精製プロテインCの物理化学的性状

SDS-PAGE法による分子量測定の結果、非還元下

のSDS-PAGEでは分子量62,000に一本のバンドを認

め、還元条件下では分子量41,000(H鎖)と21,000

(L鎖)に二本のバンドを認めた。

免疫電気泳動では、 $\alpha$ 位にのみ一本の明瞭な沈

降線を認め、抗正常ヒト血清ウサギ血清をはじめ

抗ヒトPS、F.II、F.IX、F.X ウサギ血清とは沈降線を形成しなかった。

等電点電気泳動の結果、プロテインCはpI 3.8  
~4.2 の間に連続したバンドとして認められた。

以上の結果から、単離されたプロテインCは純度99%以上と推定された。

特許出願人 株式会社 ミドリ十字  
代理人 弁理士 高島

#### 手続補正 (自発)

昭和63年6月17日 

特許庁長官殿

##### 1. 事件の表示

昭和63年特許願第54159号

##### 2. 発明の名称

プロテインCの精製方法

##### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名(名称) 株式会社 ミドリ十字

##### 4. 代理人

住所 大阪市東区平野町4丁目56番地

(湯木ビル)

TEL (06) 227-1156

高島国際特許事務所

氏名 弁理士(8079) 高島

##### 5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

特許庁  
63.6.20

## 6. 指正の内容

(1) 明細書第15頁第2行の「プロタックCサンプル」を「プロテインCサンプル」に訂正する。

(2) 明細書第16頁第2表の

スラップ	容量 (ml)	A280	PC活性 (%E)	收率 (%)	精製度 (血漿×1)
プロトロンビン 複合体濃度	2200	67.1	927	100	98

を

スラップ	容量 (ml)	A280	PC活性 (%E)	收率 (%)	精製度 (血漿×1)
プロトロンビン 複合体濃縮液	2200	67.1	927	100	98

に訂正する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**